ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 23, 6, 1989

УДК 576.895.122 : 575.8

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ DIPLODISCUS SUBCLAVATUS (TREMATODA, DIPLODISCIDAE)

Р. Б. Пяткявичюте, В. К. Киселене, Р. П. Стенько

Изучены хромосомные наборы партенит *Diplodiscus subclavatus*, принадлежащих к двум разным популяциям. Кариотип состоит из 20 хромосом. Обнаружены межпопуляционные различия и описан внутрипопуляционный хромосомный полиморфизм, заключающийся в присутствии В-хромосом в хромосомных наборах партенит одной из изученных популяций.

Цитогенетическим исследованиям уделено сравнительно мало места в обширной литературе, посвященной трематодам. Почти совсем неизученным остается вопрос об уровне внутривидовой стабильности хромосомных наборов трематод. Между тем каждая природная популяция обладает известным запасом изменчивости, будь то хромосомный, морфологический или биохимический полиморфизм. Кариологические признаки менее вариабельны, чем морфологические, но и по структуре кариотипов виды часто оказываются полиморфными (Dobzhansky, 1971; Imai, е. а., 1977; Воронцов, 1980; Стегний, 1982, и др.).

В настоящей работе приводятся данные о структуре хромосомного аппарата *Diplodiscus subclavatus* — паразита земноводных, из двух разных популяций. Кариотип этого вида изучен впервые.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал для исследования был получен от спонтанно зараженных моллюсков. Вид паразита определен по морфологическим признакам церкарий. Хромосомы изучены на препаратах от 23 экз. *Anisus spirorbis*, собранных в небольшом водоеме Шакяйского р-на Литовской ССР и от 7 экз. *Planorbis planorbis*, собранных в оз. Джалман Крымской обл. (УССР) летом 1987 г.

Для блокирования митозов в клетках партенит, моллюсков выдерживали в 0.01%-ном растворе колхицина не менее 3 ч. Отпрепарированные ткани с партенитами трематод для гипотонии помещали в дистиллированную воду на 1 ч. Фиксировали в фиксаторе Карнуа. Препараты готовили методом высушивания мазков на пламени (Kligerman, Bloom, 1977; Баршене, 1981) и окрашивали в 4%-ном растворе красителя Гимзы.

Для кариометрического анализа отбирали четкие метафазные пластинки с хорошим разбросом хромосом (было отобрано по 10 метафаз для кариометрической характеристики каждой из двух популяций). Измерение хромосом осуществляли по микрофотографиям. Определяли следующие параметры: абсолютную длину хромосом в мкм, относительную длину (отношение общей длины хромосомы к длине гаплоидного набора в процентах) и центромерный индекс (отношение длины короткого плеча к общей длине хромосомы в процентах).

Классификацию хромосом проводили согласно методу Левана с соавторами (Levan, е. а., 1964).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Диплоидный хромосомный набор партенит *D. subclavatus* от *A. spirorbis* (ЛитССР) состоит из 20 элементов. Хромосомы крупные — их абсолютная длина колеблется в среднем от 3.35 до 12.80 мкм (см. таблицу). Общая длина гаплоидного набора 66.26 мкм. В кариотипе преобладают двуплечие элементы. Выделяется 1-я пара крупных хромосом, имеющих субметацентрический тип строения и составляющих 19.3 % длины гаплоидного набора. 2, 3-я пары — субтелоцентрические, 4-я — метацентрическая, 5-я — акроцентрическая, с очень незначительным коротким плечом, 6-я — субметацентрическая. Последние 4 пары составляют группу относительно мелких хромосом набора и по положению центромеры относятся к субметацентрическому типу строения.

8 (34.78 %) из 23 исследованных моллюсков были заражены партенитами *D. subclavatus*, в клетках которых было от 20 до 30 хромосом, причем основной набор хромосом этих индивидов соответствует выше описанному кариотипу. Дополнительные хромосомы, число которых в разных клетках варьировало от 0 до 10 (изучены 84 метафазы), были примерно одинаковой длины (в сред-

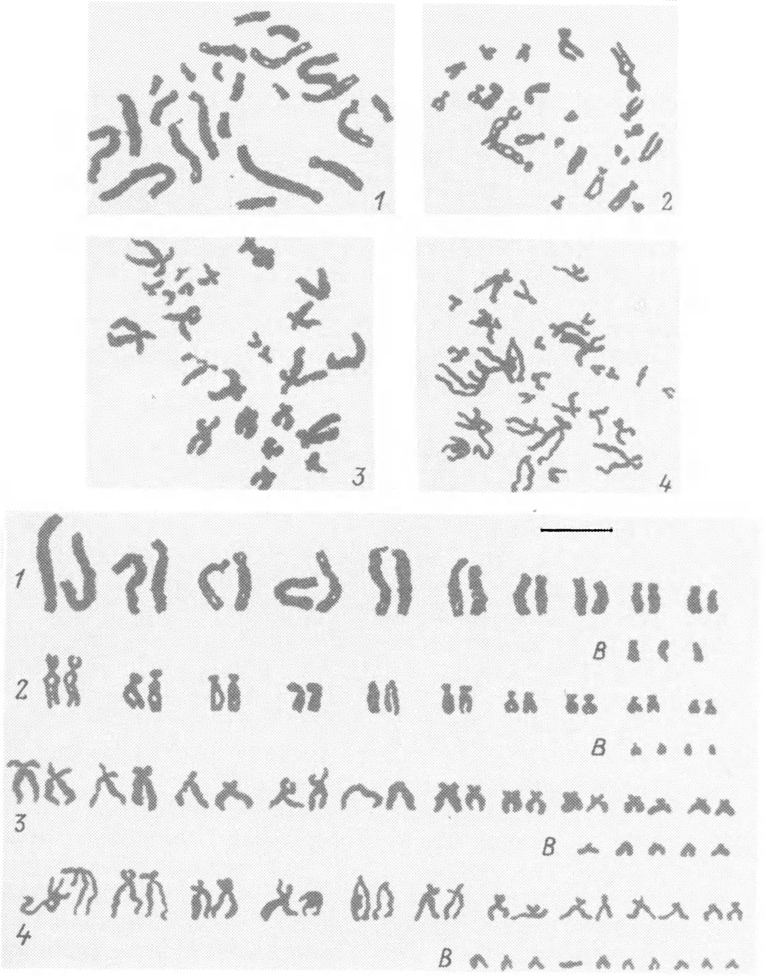

Рис. 1. Метафазные пластинки и соответствующие кариотипы четырех клеток (*1—4*) *D. subclavatus* с разным числом дополнительных хромосом (B). Шкала — 10 мкм.

Измерения и классификация хромосом *Diplodiscus subclavatus*

№ пар хромосом	Популяция	Абсолютная длина в мкм		Относительная длина в %		Центромерный индекс		Классификация
		M	m	M	m	M	m	
1	Л	12.80	0.54	19.33	0.31	28.48	0.32	см
	К	13.05	0.37	18.15	0.18	30.16	0.53	см
2	Л	9.17	0.50	13.79	0.24	23.67	0.63	ст
	К	10.23	0.39	14.19	0.23	23.23	0.79	ст
3	Л	7.69	0.36	11.58	0.16	21.60	0.49	ст
	К	8.55	0.29	11.56	0.18	19.00	0.62	ст
4	Л	7.45	0.31	11.25	0.18	38.36	0.62	м
	К	8.05	0.26	11.19	0.14	36.86	0.86	см—м
5	Л	7.00	0.37	10.53	0.24	7.45	0.51	а
	К	8.00	0.29	11.10	0.15	8.25	0.38	а
6	Л	6.17	0.25	9.33	0.17	26.47	0.74	см
	К	7.04	0.24	9.77	0.15	24.74	0.77	ст—см
7	Л	4.61	0.17	6.96	0.15	32.22	0.91	см
	К	5.28	0.15	7.34	0.11	22.56	0.81	ст
8	Л	4.26	0.10	6.46	0.14	27.97	1.17	см
	К	4.63	0.14	6.44	0.09	30.72	0.58	см
9	Л	3.76	0.15	5.69	0.15	27.43	0.88	см
	К	3.75	0.09	5.23	0.18	28.92	0.89	см
10	Л	3.35	0.12	5.08	0.13	30.05	1.01	см
	К	3.40	0.12	4.73	0.10	28.22	0.85	см

Примечание: Л — литовская, К — крымская популяции; М — средняя арифметическая, m — ошибка средней; м — метацентрическая, см — субметацентрическая, ст — субтелоцентрическая, а — акроцентрическая хромосома.

нем 2.52 мкм) и имели субтелоцентрический тип строения (значение центромерного индекса — 22.67). По своей морфологии они не соответствуют ни одной паре стандартного хромосомного набора (рис. 1).

Хромосомный набор *D. subclavatus* от *P. planorbis* (Крымская обл.) по морфологии хромосом очень близок кариотипу партенит от *A. spirorbis* (см. таблицу; рис. 2). Общая длина гаплоидного набора несколько выше и составляет 71.98 мкм. Спирализация хромосом была одинаковая на препаратах от партенит

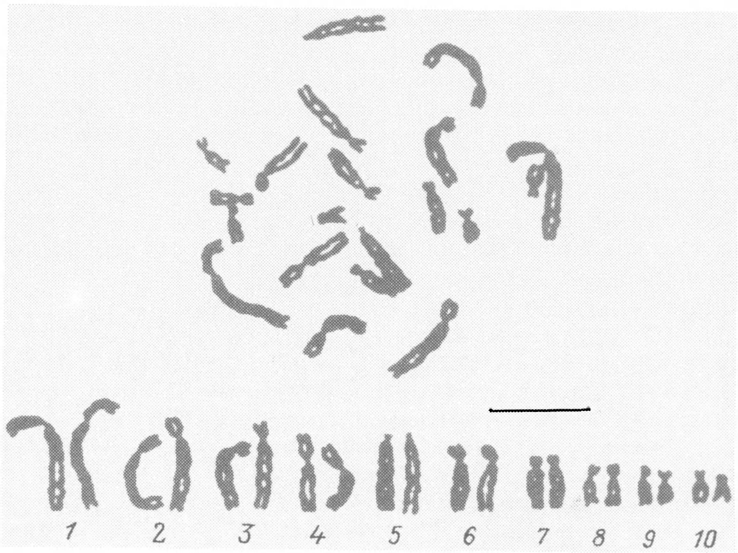

Рис. 2. Метафазная пластинка и кариотип *D. subclavatus* (*1—10*) (Крым). Шкала — 10 мкм.

обеих популяций. Основное различие в кариотипах этих двух популяций заключается в морфологии 7-й пары хромосом. В кариотипе литовской популяции *D. subclavatus* 7-я пара хромосом по значению центромерного индекса классифицируется как субметацентрическая, а в хромосомном наборе партенит крымской популяции эта пара субтелоцентрическая. Разницы значений центромерного индекса статистически достоверны ($p<0.001$). Отмечены и другие, менее значительные различия в морфологии 1, 3-й и 8-й пар хромосом ($0.01<p<0.05$). Никаких дополнительных хромосом в крымской популяции *D. subclavatus* не обнаружено.

Всего от партенит обеих популяций с диплоидными наборами $2n=20$ изучено 112 клеток. Модальное число хромосом содержалось в 103 (91.96 %) клетках, 8 клеток были анеуплоидными и 1 — тетраплоидная.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известна лишь одна работа (Романенко, 1974), в которой имеются сравнительно-кариологические данные по двум популяциям *Liorchis scotiae*. Автором отмечены различия в морфологии отдельных пар хромосом, связанные с перестройками типа перицентрических инверсий. Перицентрическими инверсиями обусловлен и внутрипопуляционный полиморфизм 4-й пары хромосом трех видов рода *Paragonimus*, выявленный с помощью С-окраски хромосом (Hirai, e. a., 1985).

При изучении двух популяций *D. subclavatus* нами обнаружен межпопуляционный и внутрипопуляционный хромосомный полиморфизм. Кариотипы этих популяций достоверно отличаются по строению 7-й пары хромосом основного набора. Различие заключается в значении центромерного индекса. Оно могло возникнуть вследствие перицентрической инверсии небольшого участка хромосомы. Менее значительные различия морфологии 1, 3-й и 8-й пар хромосом могут быть следствием небольших делеций или дупликаций, а также и инверсий. Уверенно судить о характере хромосомных мутаций при анализе обычно окрашенных хромосом трудно. Следует отметить, что при такой окраске выявляются не все типы хромосомных перестроек. Для более тонкого анализа следует применять дифференциальную окраску хромосом.

Для наглядного сравнения на рис. 3 даны идиограммы кариотипов обеих популяций, построенные по данным относительных длин и центромерных индексов, представленных в таблице.

Возникновению межпопуляционных кариологических различий могла способствовать географическая изоляция; кроме того, надо обратить внимание и на то, что партениты изучены от разных видов промежуточных хозяев, и хотя в роли промежуточных хозяев *D. subclavatus* зарегистрированы разные виды планорбид (Скрябин, 1947; Odening, 1978), указанные различия могут быть следствием коэволюционных взаимоотношений в конкретных системах паразит—хозяин, так как коэволюционные связи в системе трематода—моллюск являются очень тесными (Гинецинская, 1968).

Так как других данных по сравнительно-кариологическому исследованию разных популяций одного вида трематод нет, трудно судить о том, насколько широко распространен полиморфизм подобного характера среди представителей этого класса. Предполагается, что кариологическая стабильность связана с репродуктивной биологией животных, а именно, с низкой репродуктивностью, большой подвижностью и отсутствием ограниченных ниш, например у ластоногих и китообразных (Arnason, 1972; Анбиндер, 1980). Что касается трематод, то черты их биологии — высокая плодовитость, наличие строго обособленных экологических ниш, наличие партеногенетических стадий развития, позволяют ожидать довольно большой кариологической лабильности. Однако, с другой стороны, тесные коэволюционные связи с другим организмом — хозяином и

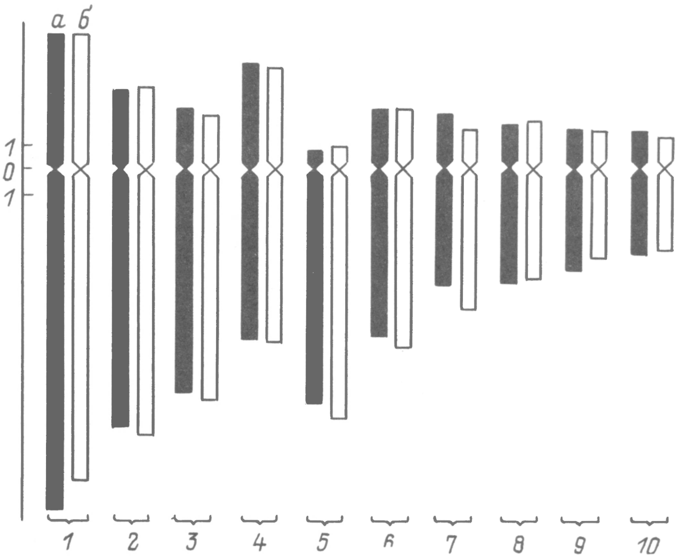

Рис. 3. Идиограммы хромосомных наборов *D. subclavatus*.

а — литовская, *б* — крымская популяции. По оси ординат — относительная длина хромосом.

необходимость поддерживать стабильные коадаптированные комплексы генов, видимо, накладывают свой отпечаток на уровень внутривидовой и надвидовой стабильности кариотипов трематод.

Полиморфизм другого типа, обнаруженный при исследовании хромосомных комплексов *D. subclavatus* литовской популяции, связан с присутствием дополнительных хромосом в кариотипах партенит от части изученных индивидов *A. spirorbis*. По-видимому, эти дополнительные хромосомы представляют собой В-хромосомы. В-хромосомы известны у нескольких сотен видов животных и растений (Jones, 1975). Функциональная их роль неясна. Часто они содержат гетерохроматинизированную ДНК и являются генетически относительно инертным материалом.

Хотя никаких специальных исследований по этому поводу нами не проводилось, но каких-либо отклонений в строении церкарий не обнаружено. Видимо, дополнительные хромосомы не оказывают заметного влияния на морфологию церкарий.

Распределение дополнительных хромосом в клетках партенит от 8 особей моллюсков показано на рис. 4. Можно заметить, что в большинстве случаев в клетках преобладает какое-то определенное число дополнительных хромосом, чаще четное, что говорит о возможном существовании механизма их неслучайного распределения. 10 добавочных хромосом присутствовало лишь в нескольких клетках партенит от одного моллюска. Может быть, при аккумуляции большего числа этих хромосом проявляется сильный отрицательный эффект, и отбор препятствует чрезмерному их накоплению в клетках.

Ранее В-хромосомы были описаны нами у трех видов рода *Notocotylus* (Пяткявичюте, Баршене, 1987, 1988). Но для видов этого рода характерны В-хромосомы другого типа — крупные метацентрические элементы, которые чаще всего встречались по одному во всех клетках. Больше данных о присутствии дополнительных хромосом в кариотипах трематод в литературе нет, за исключением одной работы (Short, Menzel, 1960), в которой авторы описали два кариотипа *Trichobilharzia stagnicola* — $2n=16$ и $2n=18$, отличающиеся присутствием дополнительной пары мелких хромосом во втором из них. Авторы

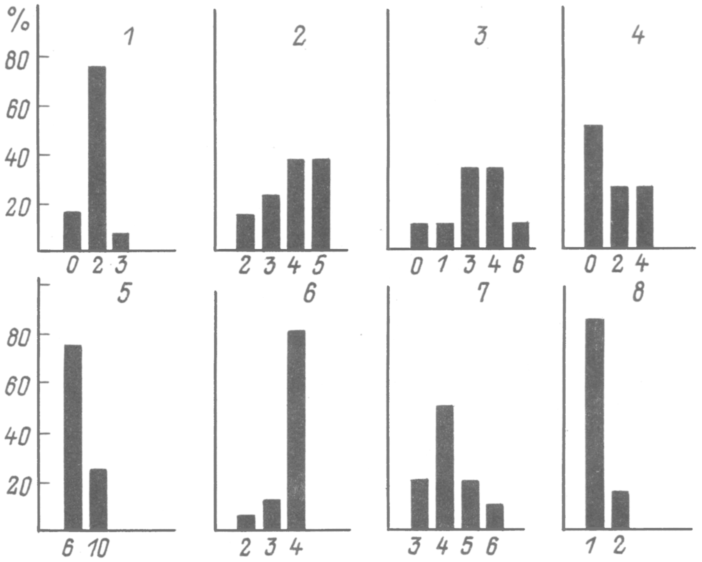

Рис. 4. Распределение дополнительных хромосом в клетках партенит от 8 индивидов изученных моллюсков.

По оси абсцисс — число дополнительных хромосом в клетке, по оси ординат — количество изученных клеток, в %.

объяснили это явление тем, что были исследованы скорее всего два близких вида, а не две кариоморфы одного вида.

В литературе имеются сообщения о цитогенетических исследованиях еще двух видов сем. Diplodiscidae: *Diplodiscus amphichrus magnus* (Saksena, 1962) *Megalodiscus temperatus* (Van Der Woude, 1954; Saksena, 1969; Grossman, Cain, 1981). (Род *Megalodiscus* неоднократно сводился в синоним *Diplodiscus*).

В диплоидном наборе *D. amphicrus magnus* обнаружено 18 хромосом. Судить о их морфологии можно лишь весьма приблизительно, так как работа проводилась на материале, не обработанном колхицином. Однако можно предположить, что кариотип с 18 хромосомами мог возникнуть от 20-хромосомного набора путем транслокации генетического материала одной из маленьких хромосом на элемент средних размеров. Вследствие такой перестройки в хромосомном наборе *D. amphicrus magnus*, видимо, образовалась вторая пара крупных метацентрических хромосом и остались лишь 3 пары мелких элементов (в кариотипе *D. subclavatus* 1 пара крупных хромосом и 4 пары относительно мелких).

Данные о структуре кариотипа *M. temperatus* не совпадают в работах разных авторов: по одним данным содержат диплоидный набор 18 хромосом (Van Der Woude, 1954; Saksena, 1969), по другим — 20 хромосом. По морфологии хромосом (5 пар крупных, 3 пары средних и 2 пары маленьких акроцентрических хромосом) (Grossman, Cain, 1981) он имеет мало общего с кариотипами *D. subclavatus* и *D. amphichrus magnus*. Как показывают многие исследования близких видов трематод, для них характерна довольно высокая стабильность кариотипов на уровне рода, отражающаяся в некой однотипности плана строения кариотипа. Указанное несовпадение кариологических данных скорее всего является следствием ошибочного определения вида, чем столь значительных изменений структуры хромосомного аппарата одного из близких видов.

Литература

Анбиндер Е. М. Кариология и эволюция ластоногих. М.: Наука, 1980. 152 с.

Баршене Я. В. Методические рекомендации по цитогенетическим исследованиям различных видов рыб в их ареалах // Типовые методики исследования продуктивности видов рыб в пределах их ареалов. Ч. 4. Вильнюс, 1981. С. 86—95.

Воронцов Н. Н. Синтетическая теория эволюции: ее источники, основные постулаты и нерешенные проблемы // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1980. Т. 25. С. 295—315.

Гинецинская Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука, 1968. 412 с.

Пяткявичюте Р. Б., Баршене Я. В. Внутрипопуляционная изменчивость кариотипов трематод рода Notocotylus // Популяционная биология гельминтов. (Тез. докл.). М., 1987. С. 140—141.

Пяткявичюте Р. Б., Баршене Я. В. Сравнительно-кариологический анализ трех видов трематод рода Notocotylus // Паразитология. 1988. Т. 22, вып. С. 21—28.

Романенко Л. Н. Изучение хромосомных наборов некоторых видов трематод подотряда Paramphistomatata // Матер. Всесоюз. о-ва гельминтол. 1974. Вып. 26. С. 226—239.

Скрябин К. И. Трематоды животных и человека. Т. 3. М.; Л., 1949. 624 с.

Стегний В. Н. Проблемы популяционной цитогенетики двукрылых насекомых // Эволюционная генетика. Л., 1982. С. 60—85.

Arnason U. The role of chromosomal rearrangement in mamalian speciation with special reference to Cetacea and Pinipedia // Hereditas. 1972. Vol. 70. P. 113—118.

Dobzhansky Th. Genetics of evolution process. New York, Lond.: Columbia Univ. Press, 1971. 520 p.

Grossman A. I., Cain G. D. Karyotypes and chromosome morphologies of Megalodiscus temperatus and Philophthalmus gralli // J. Helminthol. 1981. Vol. 55. P. 71—78.

Hirai H., Sakaguchi Y., Habe S., Imai H. T. C-banding analysis of six species of lung flukes, Paragonimus spp. (Trematoda: Platyhelminthes), from Japan and Korea // Z. Parasitenkd. 1985. Vol. 71. P. 617—629.

Imai H. T., Crosier R. H., Taylor R. W. Karyotype evolution in Australian ants // Chromosoma. 1977. Vol. 59. P. 341—393.

Jones R. N. B-chromosome systems in flovering plants and animal species // Int. Rev. Cytol. 1975. Vol. 40. P. 1—100.

Kligerman A. D., Bloom S. E. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes // J. Fish. Res. Board Can. 1977. Vol. 34. P. 266—269.

Levan A. K., Fredga K., Sandberg A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas. 1964. Vol. 52. P. 201—220.

Odening V. K. Trematodenliste der DDR // Angev. Parasitol. 1978. Jg. 19. S. 168—186.

Saksena J. N. Chromosome studies in digenetic trematodes of the family Paramphistomatidae // Proc. Nat. Acad. Sci. India. 1962. Vol. 32. P. 177—184.

Saksena J. N. Chromosome studies of fifteen species of Indian digenetic trematodes // Proc. Nat. Acad. Sci. India. 1969. Vol. 39. P. 81—100.

Short R. B., Menzel M. Y. Chromosomes of nine species of schistosomes // J. Parasitol. 1960. Vol. 46. P. 273—287.

Van Der Woude A. Germ cell cycle of Megalodiscus temperatus (Stafford, 1905) Harwood, 1932 (Paramphistomatidae: Trematoda) // Am. Midland Naturalist. 1954. Vol. 51. P. 172—202.

Институт зоологии и паразитологии АН ЛитССР,
Вильнюс;
Симферопольский государственный университет
им. М. В. Фрунзе

Поступила 24.03.1988

CYTOGENETIC ANALYSIS OF TWO POPULATIONS OF DIPLODISCUS SUBCLAVATUS (TREMATODA, DIPLODISCIDAE)

R. B. Petkevičiūte, V. K. Kiseliene, R. P. Stenko

SUMMARY

The karyotypes of two distinct populations of *Diplodiscus subclavatus* obtained from the Lithuanian and Ukrainian SSR were described and their chromosomal morphology was compared. The diploid chromosome number of somatic cells of parthenogenetic generations is 20. The karyotypes are composed mainly of biarmed chromosomes. Karyological analysis revealed interpopulation differences in the chromosome morphology of pair N 7. The occurrence of B-chromosomes in the chromosome set in one of the studied populations was detected. B-chromosomes were the smallest elements in the karyotypes, subtelocentrics. Their number ranged from 0 to 10 in different cells.